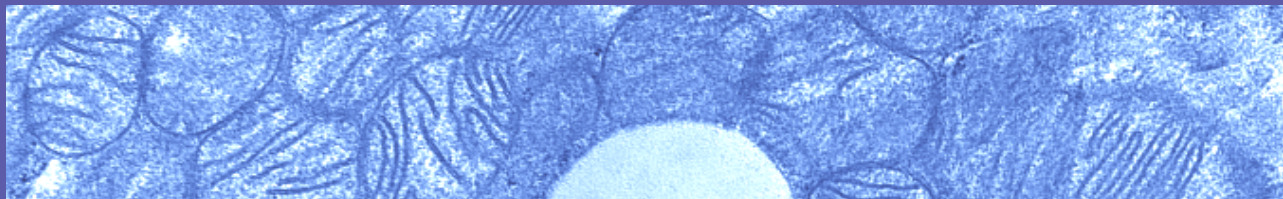
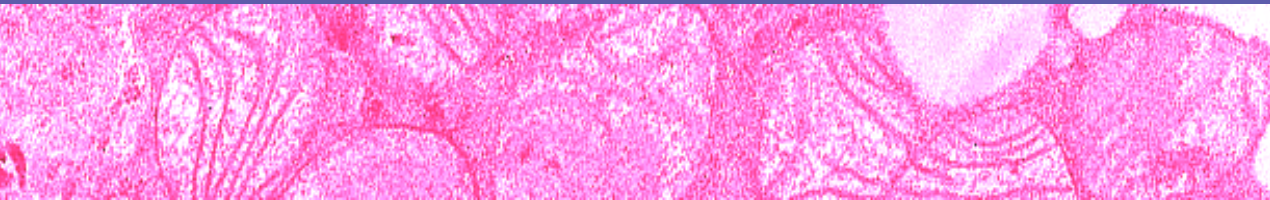


Función y biogénesis mitocondrial. Diferencias entre géneros

Roberto Justo López



Universitat de les Illes Balears

2005



Universitat de les Illes Balears

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut
Grupo de Investigación de Metabolismo Energético y Nutrición

FUNCIÓN Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL. DIFERENCIAS ENTRE GÉNEROS

Tesis doctoral para optar al Grado de

Doctor por la Universitat de les Illes Balears

Programa de doctorado de Nutrición Molecular
del Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Presentada por:
Roberto Justo López

Palma, Junio de 2005

Con el visto bueno de los Directores

Dra. Magdalena Gianotti Bauzá
Catedrática de Escuela Universitaria
de Bioquímica y Biología Molecular

Dr. Jordi Oliver Oliver
Titular de Escuela Universitaria
de Bioquímica y Biología Molecular

El interesado

Roberto Justo López

A mis padres y mis hermanas, os quiero.

*Hay una fuerza motriz más poderosa que
el vapor, la electricidad y la energía atómica: la
voluntad.*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Aunque parezca que ésta es la parte más fácil de la tesis, son tantas las personas que han contribuido de forma directa o indirecta en su desarrollo, que nunca se sabe por donde empezar y si te estás dejando a alguien por el camino.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Magdalena Gianotti y al Dr. Jordi Oliver la tarea de dirección llevada a cabo en esta tesis, ya que sin ellos todo esto no hubiera sido posible. En particular, me gustaría agradecer a la Dra. Gianotti el haberme iniciado en el mundo de la investigación cuando únicamente era un chico de 19 años, cargado de mucha ilusión, pero no mucho más, allá por el año 1996.

Me gustaría agradecer a todos los profesores que forman parte del *Grup d'Investigació de Metabolisme Energètic i Nutrició de la Universitat de les Illes Balears*, por todos los sabios consejos y años de formación derrochados en mí, además de hacerme sentir como uno más de la gran familia científica que somos: a la Dra. Pilar Roca (gracias por darme ánimos en la recta final de esta tesis), al Dr. Francisco José García (mis inicios en la investigación y en el estudio de la gestación), a la Dra. Isabel Lladó (muy hábil en la interpretación científica), a la Dra. Ana María Proenza (siempre disponible para cualquier cosa, muchas gracias de todo corazón) y a los señores Jaume Balaguer (gracias por tus sensatos consejos, sobre todo pedagógicos) y Josep Antonio Pablo (mi estimado asesor de HPLC).

Me gustaría agradecer al Dr. Jordi Bermúdez la oportunidad que me ofreció de colaborar en su grupo de investigación en los años 2002 y 2003, perteneciente a la *Unitat de Biofísica del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona*, Campus de Bellvitge: *Jordi, en especial me gustaría destacar todo el equipo humano que has conseguido reunir en tu laboratorio, la Dra. Teresa Roig, al Dr. Jordi Boada y en especial, a mi gran compañero y amigo de fatigas durante mi estancia, a Eduardo Cuesta.*

A todos mis compañeros del laboratorio de Bioquímica, los que estuvieron y los que aún están, que han hecho más amena la ardua tarea de investigar. Ya que me es imposible poner a todos los que pasaron en 10 años, me gustaría destacar entre todos ellos a Tomeu y a Pili, que han sabido darme buenos consejos en las etapas de tesis más críticas; también a Ádamo, por las charlas científicas que hemos tenido y que han servido para ampliar mis humildes conocimientos científicos, que también forman parte de esta tesis.

A los *Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de les Illes Balears*, que han colaborado en la mayoría de trabajos científicos que he realizado durante estos años. Gracias a María Pocoví, Ferran Hierro, Maribel y Bea, ya que sin vosotros no hubiera sido lo mismo. También una reseña al personal de administración y servicios de la *Universitat*, por facilitar nuestro trabajo en todo lo posible. He de hacer una mención especial a la *Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears*, por otorgarme la beca de personal investigador que ha hecho posible que yo pudiera dedicar todo mi tiempo a la elaboración de esta tesis.

A todos los compañeros del Departamento de Tecnología, Dibujo y Música del *IES S'Arenal*, por todos los momentos compartidos, por soportar mis locuras pasajeras y por ser tan amables conmigo, sobre todo en los momentos más exigentes de esta tesis. Quisiera destacar entre todos a mi dulce Adela, por ser tan buena persona: ojalá muchos fueran como tú.

A mis amigos, a los que he llamado siempre para celebrar los momentos más dulces, y que han acudido a mí en los momentos más duros. Muchas gracias a mis *muy mejores amigos* Kike y José (y a todos sus familiares), a Francisco Pino, a Paco, a Sito, a Tito y Bea.

A mi familia, que espero haber heredado alguna parte de ellos: a mi padre, no me cansaré de repetir que es mi *Ave Fénix*; a mi madre, por hacer que nunca me falte de nada y darme todo su cariño; a mis hermanas Sonia y Noemí: no puedo expresar todo lo que os debo, estoy en deuda perpetua con vosotras.

Roberto Justo

ÍNDICE

ABREVIATURAS	II
RESUMEN	III
LISTADO DE PUBLICACIONES	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El tejido adiposo marrón y la termogénesis facultativa. Papel de las proteínas desacoplates	3
1.1.1. El tejido adiposo marrón	3
1.1.2. Regulación fisiológica de la termogénesis del TAM	4
1.1.3. Otras proteínas desacoplates: la UCP2 y la UCP3	5
1.2. Biogénesis mitocondrial	6
1.2.1. Estructura del genoma mitocondrial	6
1.2.2. Transcripción y replicación del ADNmt	7
1.2.3. Regulación de la transcripción de proteínas mitocondriales codificadas por el núcleo	8
1.2.4. Tráfico intracelular de proteínas a la mitocondria	9
1.2.5. La cardiolipina. Un nexo de unión entre la estructura, la función y la biogénesis mitocondrial	10
1.2.6. El modelo de subpoblaciones mitocondriales como herramienta para el estudio de la biogénesis mitocondrial	10
1.3. Dimorfismo sexual en el balance energético. Implicación de las hormonas sexuales	12
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	15
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1. Manuscrito I. Brown adipose tissue mitochondrial subpopulations show different morphological and thermogenic characteristics	23
3.2. Manuscrito II. Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations	35
3.3. Manuscrito III. Gender differences in brown adipose tissue thermogenic features are due to more highly differentiated mitochondria in female rats	49
3.4. Manuscrito IV. Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis	69
4. RECAPITULACIÓN	79
5. CONCLUSIONES	85
6. BIBLIOGRAFÍA	89
7. ANEXO	99
7.1. Manuscrito V. Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue	101
7.2. Manuscrito VI. Morphofunctional changes in the mitochondrial subpopulations of conceptus tissues during the placentation process	109
7.3. Manuscrito VII. Gender- and site-related effects on lipolytic capacity of rat white adipose tissue	123

ABREVIATURAS

5'-ND	5'-nucleotidasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADP	adenosina difosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina trifosfato
ATPasa	adenosina trifosfato sintasa
CAT	catalasa
COX	citocromo c oxidasa
CREB	proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
CS	citrato sintasa
Cyt C	citocromo c
D-loop	bucle de desplazamiento
GDP	guanosina difosfato
G _i	proteínas G inhibitorias
GPx	glutación peroxidasa
G _s	proteínas G estimuladoras
GTP	guanosina trifosfato
HSP	promotor de la cadena pesada del ADNmt
LDH	lactato deshidrogenasa
LSH	lipasa sensible a hormonas
LSP	promotor de la cadena ligera del ADNmt
NRF	factor de respiración mitocondrial
PA	fosfatasa ácida
PGC	coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma
PKA	proteína kinasa A
PPAR-γ	receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma
PRC	coactivador relacionado con el PGC
SOD	superóxido dismutasa
TAM	tejido adiposo marrón
TFAM	factor de transcripción mitocondrial A
TFB1M	factor de transcripción mitocondrial B1
TFB2M	factor de transcripción mitocondrial B2
UCP	proteína desacoplante



FUNCIÓN Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL. DIFERENCIAS ENTRE GÉNEROS

Tesis doctoral. Roberto Justo López, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, España.

Resumen

Los estudios llevados a cabo en la presente tesis se sustentan en tres aspectos básicos: a) la heterogeneidad de la población mitocondrial y la posibilidad de ser fraccionada en distintas subpoblaciones que difieren en sus características morfológicas y funcionales, b) las diferencias entre géneros en la función mitocondrial del tejido adiposo marrón y del hígado de rata, y c) la utilidad del modelo de subpoblaciones mitocondriales como herramienta para el estudio de la biogénesis mitocondrial, entendida como un proceso clave en el funcionamiento celular, que consta, a su vez, de dos procesos diferentes e íntimamente ligados: la proliferación y la diferenciación mitocondrial.

El objetivo principal de este trabajo se ha centrado en el estudio de las diferencias entre ratas macho y hembra en la morfología, la función y la biogénesis mitocondrial del tejido adiposo marrón (TAM), principal efector de la termogénesis facultativa o adaptativa, y del hígado, órgano clave en el metabolismo intermediario y energético.

El análisis del tejido adiposo marrón y del hígado ha puesto de manifiesto un claro dimorfismo sexual en las propiedades morfofuncionales de las distintas subpoblaciones mitocondriales estudiadas. En concreto, la subpoblación ligera, constituida por mitocondrias menos diferenciadas, presenta características similares en ambos géneros. Por el contrario, en las hembras, la subpoblación pesada muestra una mayor capacidad funcional, acompañada de una mayor tendencia a la transcripción del ADNmt, lo que se traduce en una mayor maquinaria funcional. Las diferencias en las características mitocondriales del TAM y del hígado descritas entre ambos géneros, podrían ser atribuidas a la existencia de una subpoblación mitocondrial altamente diferenciada en las hembras, hecho que podría ser indicativo de un proceso de biogénesis mitocondrial distinto entre ambos géneros.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que las diferencias entre géneros en las características morfofuncionales de las subpoblaciones mitocondriales son similares en tejido adiposo marrón e hígado: una subpoblación mitocondrial poco diferenciada con propiedades comunes en ambos géneros, y otra subpoblación con mitocondrias mucho más diferenciadas en las hembras. Por tanto, el modelo de subpoblaciones ha puesto de manifiesto una clara divergencia en el proceso de diferenciación mitocondrial entre ambos géneros, tanto en el TAM como en el hígado, lo que sugeriría, en primer lugar, una distinta evolución de dicho proceso entre machos y hembras y, en segundo lugar, un factor común a ambos tejidos que influiría en la regulación del proceso de biogénesis mitocondrial. En este sentido, las hormonas sexuales podrían ser los candidatos idóneos para cumplir estas dos premisas.

LISTADO DE PUBLICACIONES

Esta tesis se basa en los siguientes artículos:

- Manuscrito I.* **Justo R, Oliver J, Gianotti M.** Brown adipose tissue mitochondrial subpopulations show different morphological and thermogenic characteristics. *Mitochondrion* 5: 45-53, 2005.
[doi:10.1016/j.mito.2004.09.003](https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.09.003)
- Manuscrito II.* **Justo R, Frontera M, Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Lladó I, García-Palmer FJ, Roca P, Gianotti M.** Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. *Life Sci* 76: 1147-1158, 2005.
[doi:10.1016/j.lfs.2004.08.019](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.019)
- Manuscrito III.* **Justo R, Boada J, Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Bermúdez J, Gianotti M, Oliver J.** Gender differences in brown adipose tissue thermogenic features are due to more highly differentiated mitochondria in female rats. *Manuscrito*.
- Manuscrito IV.* **Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermúdez J, Gianotti M.** Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*: 30 Mar, 2005.
[doi:10.1152/ajpcell.00035.2005](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00035.2005)
- Durante la realización de la presente tesis, el doctorando ha participado activamente en la elaboración de otros trabajos relacionados con el tema de la tesis que han dado lugar a las publicaciones que se presentan en el Anexo:
- Manuscrito V.* **Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Justo R, Frontera M, Oliver J, Gianotti M, Roca P.** Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 277: 42958-42963, 2002.
[doi:10.1074/jbc.M207229200](https://doi.org/10.1074/jbc.M207229200)
- Manuscrito VI.* **Justo R, Alcolea MP, Colom B, Riera AN, Gianotti M, García-Palmer FJ.** Morphofunctional changes in the mitochondrial subpopulations of conceptus tissues during the placentation process. *Cell Mol Life Sci* 59: 2199-2209, 2002.
[doi:10.1007/s000180200019](https://doi.org/10.1007/s000180200019)
- Manuscrito VII.* **Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Frontera M, Justo R, Lladó I, Kraemer FB, Gianotti M, Roca P.** Gender- and site-related effects on lipolytic capacity of rat white adipose tissue. *Cell Mol Life Sci* 60: 1982-1989, 2003.
[doi:10.1007/s00018-003-3125-5](https://doi.org/10.1007/s00018-003-3125-5)

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

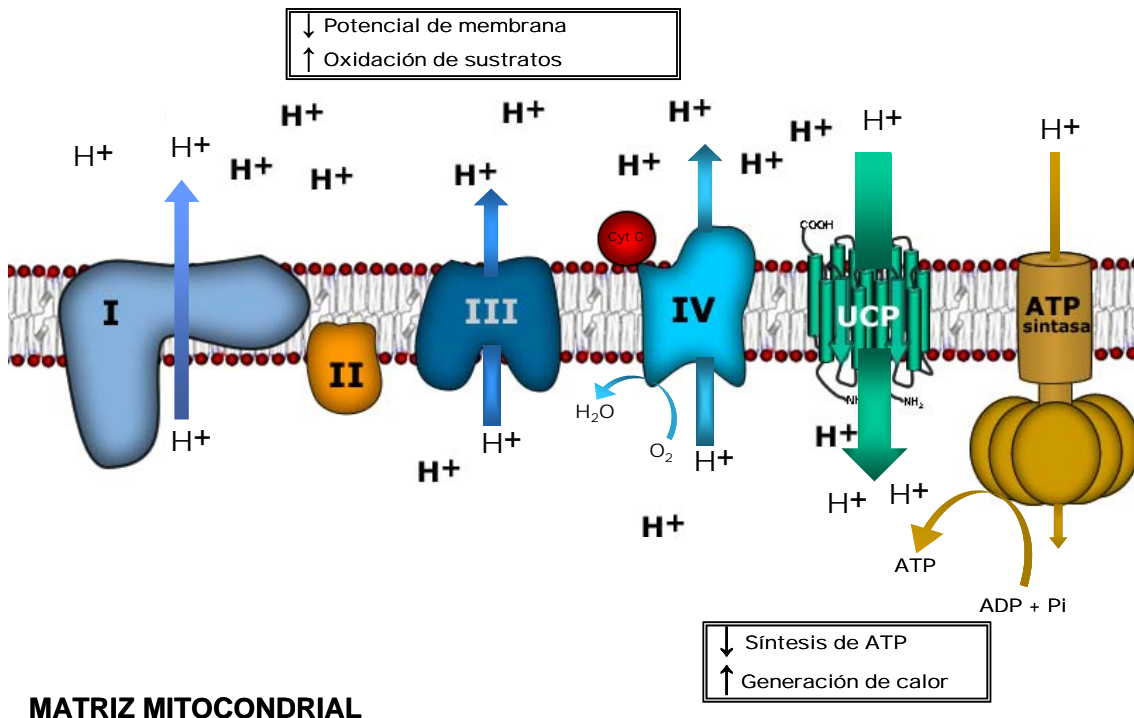
1.1. El tejido adiposo marrón y la termogénesis facultativa. Papel de las proteínas desacoplantes

1.1.1. El tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón (TAM) es un órgano clave en el metabolismo energético de pequeños mamíferos y recién nacidos, ya que es el principal efector de la termogénesis facultativa o adaptativa (Himms-Hagen, 1990; Shrago and Strielemann, 1987), proceso que consiste en la generación de calor en respuesta a determinados estímulos tales como la exposición al frío o un excedente calórico procedente de la dieta (Lowell and Spiegelman, 2000). El TAM es un tejido altamente vascularizado e innervado por el sistema nervioso simpático y sus propiedades vienen determinadas por las características de las células que lo constituyen, principalmente por los adipocitos marrones. Desde el punto de vista morfológico, estas células presentan una geometría poliédrica, con numerosas vacuolas lipídicas repartidas por todo el citoplasma, un núcleo esférico situado en su zona central y un elevado número de mitocondrias de gran tamaño y con una gran densidad de crestas (Cinti, 2002).

La actividad termogénica del TAM depende de la presencia de la proteína desacoplante 1 o UCP1, ubicada en la membrana interna mitocondrial de los adipocitos marrones. La UCP1 tiene la capacidad de disipar el gradiente protónico generado por la cadena respiratoria, desacoplando la fosforilación oxidativa. De esta forma la UCP1 aumenta la conductividad protónica de la membrana interna, reactivando la oxidación de sustratos y generando calor de forma inherente al proceso (Cannon and Nedergaard, 2004; Himms-Hagen, 1990; Nicholls et al., 1986). La actividad de la UCP1 es sensible a variaciones del metabolismo celular, ya que es inhibida por nucleótidos de purina di- o trifosfato (ADP, ATP, GDP y GTP) y activada en presencia de ácidos grasos (Kozak and Harper, 2000; Nicholls, 1974), siendo éstos últimos los principales combustibles encargados de mantener la capacidad termogénica del tejido (Rousset et al., 2004).

ESPACIO INTERMEMBRANA



MATRIZ MITOCONDRIAL

Figura 1. Hipótesis clásica del funcionamiento de la UCP1 en la mitocondria. La oxidación de sustratos a través de la cadena respiratoria produce un bombeo de protones al espacio intermembrana mitocondrial, que produce un gradiente electroquímico que puede ser disipado a través de la ATP sintasa, generando ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico o a través de la UCP1. La disipación del gradiente protónico reactiva la cadena respiratoria y el metabolismo oxidativo, produciendo calor de forma inherente al proceso.

1.1.2. Regulación fisiológica de la termogénesis del tejido adiposo marrón

La función termogénica del TAM está regulada principalmente a través de la secreción de noradrenalina por parte del sistema nervioso simpático. Los efectos de la noradrenalina en el adipocito marrón maduro están mediados por un balance entre los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos que coexisten en la misma célula: los receptores β (β_1 , β_2 y β_3) y los receptores α_{2A} adrenérgicos (Lafontan et al., 1997), siendo particularmente importantes en la diferenciación de los adipocitos marrones de roedores los receptores β_3 (Collins et al., 1994).

Tras la unión de la noradrenalina, los receptores β -adrenérgicos se acoplan a proteínas G estimuladoras (G_s) que activan la adenilato ciclasa, aumentando de esta forma los niveles de AMPc intracelulares. Un aumento en la concentración de AMPc en la célula produce una activación de la proteína kinasa A (PKA), el efector de la señal adrenérgica, que fosforila dianas específicas implicadas en la función lipolítica, la

proliferación y la diferenciación del adipocito marrón. La actividad de la PKA está relacionada con la activación de la lipasa sensible a hormonas (LSH), que es el paso limitante del proceso de lipólisis (Carey, 1998), la inactivación de las perilipinas (proteínas asociadas a la superficie de las gotículas de grasa que evitan la acción de la LSH sobre los triglicéridos) (Londos et al., 1999) y la activación de la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), factor de transcripción relacionado con la expresión de la UCP1 en el TAM (Nedergaard et al., 2001).

A diferencia de los efectos que producen los receptores β -adrenérgicos sobre el adipocito marrón, los receptores α_{2A} adrenérgicos al unirse con la noradrenalina se acoplan a proteínas G inhibitorias (G_i), que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (Svoboda et al., 1996), disminuyendo los niveles intracelulares de AMPc y reduciendo de esta forma la actividad de la PKA.

La noradrenalina ejerce una acción dual sobre el control de la función del adipocito ya que puede interaccionar tanto con los receptores α_{2A} adrenérgicos como con los β -adrenérgicos. Por tanto, el balance entre los distintos subtipos de receptores es clave para modular la acción de la noradrenalina (Valet et al., 2000).

1.1.3. Otras proteínas desacoplates: la UCP2 y la UCP3

Más recientemente, se han descubierto otras proteínas desacoplates homólogas a la UCP1, la UCP2 y la UCP3 (Boss et al., 1997; Fleury et al., 1997). La UCP2 muestra una distribución corporal más amplia que la UCP1, expresándose de forma abundante en el tejido adiposo blanco, intestino, pulmón y bazo, mientras que la UCP3 se expresa principalmente en el músculo esquelético (Ricquier and Bouillaud, 2000). Existe aún cierta controversia acerca del papel termogénico de la UCP2 y la UCP3 en la mitocondria, ya que sus niveles son muy reducidos en comparación con los de la UCP1 (Dulloo and Samec, 2001); en este sentido, se atribuyen a la UCP2 y UCP3 funciones relacionadas con distintos aspectos de la fisiología celular, como moduladoras de la formación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Echtay et al., 2002; Jezek et al., 2004) o en el metabolismo lipídico, facilitando el transporte de ácidos grasos del citoplasma a la mitocondria para su posterior oxidación (Crescenzo et al., 2003; Ricquier et al., 2000).

1.2. Biogénesis mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo que está presente en el citoplasma de las células eucariotas, cuya función principal en la mayoría de tejidos es la de proveer energía en forma de ATP, a partir de la oxidación de sustratos energéticos por parte de la cadena respiratoria. La población mitocondrial es dinámica y muestra variaciones en el tamaño, el número y la masa durante las diversas etapas del desarrollo, la diferenciación celular y en respuesta a diversas situaciones fisiológicas y patológicas (Goffart and Wiesner, 2003).

En el fenómeno de biogénesis mitocondrial confluyen dos procesos íntimamente ligados: la proliferación que consiste en el aumento del número de mitocondrias por célula, y la diferenciación, mediante la cual el orgánulo adquiere las características estructurales y funcionales adecuadas para el desarrollo de las funciones específicas de las distintas células del organismo (Nisoli et al., 2004).

En el control de la biogénesis mitocondrial participan numerosos factores, como la regulación de la expresión y la replicación del genoma mitocondrial, la expresión y el transporte a la mitocondria de diversas proteínas codificadas por genes nucleares, y la coordinación de todos estos procesos.

1.2.1. Estructura del genoma mitocondrial

La estructura, el contenido genético y la organización del genoma mitocondrial están muy conservadas en las distintas especies de mamíferos (Fernández-Silva et al., 2003). El ADN mitocondrial (ADNmt) muestra numerosas diferencias respecto al ADN nuclear: es un ADN circular de doble cadena, de aproximadamente 16500 pares de bases y es poliploide (Miller et al., 2003; Reynier et al., 2001), teniendo en cuenta que cada mitocondria puede contener un número variable de copias que oscila entre 2 y 10 (Wiesner et al., 1992).

Cada una de las hebras del ADNmt tiene una distinta composición de nucleótidos de guanina y de timina, y son denominadas de forma convencional hebra pesada y hebra ligera. El ADNmt de mamíferos codifica para 37 genes, que se encuentran distribuidos de manera asimétrica entre las dos hebras: la mayor parte de los genes se localizan en la hebra pesada, entre los que se encuentran los dos ARN ribosómicos (ARNr), 14 ARN de transferencia (ARNt) y los ARN mensajeros (ARNm) de 12 de los 13 polipéptidos para los que codifica el genoma mitocondrial; la hebra

ligera únicamente codifica para el resto de los ARNt (un total de 8) y un solo ARNm (Attardi and Schatz, 1988).

Las células con una elevada actividad metabólica presentan en el ADNmt el denominado bucle de desplazamiento o D-loop, una estructura de triple hélice que es muy variable entre especies, aunque tiene elementos muy conservados como el origen de replicación de la cadena pesada y los promotores de transcripción, tanto de la cadena pesada (HSP) como de la ligera (LSP) (Bogenhagen et al., 1986; Montoya et al., 1982).

1.2.2. Transcripción y replicación del ADNmt

El ADNmt codifica para polipéptidos esenciales en el funcionamiento de la mitocondria (Wallace, 1992). La transcripción de sus genes está sometida a una fina regulación y su expresión está coordinada con la de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo (Attardi and Schatz, 1988; Neupert, 1997; Tzagoloff, 1982). Además, el proceso de replicación del ADNmt está estrechamente ligado con el de transcripción ya que, para que se inicie la replicación, es necesario un cebador de ARN, producto de la transcripción de la hebra ligera del ADNmt (Clayton, 1992).

El genoma mitocondrial, a diferencia del nuclear, se transcribe de forma completa a partir de los promotores de transcripción HSP y LSP, generando en el proceso dos ARNm, uno por cada hebra (Aloni and Attardi, 1971; Murphy et al., 1975). La iniciación de la transcripción requiere la actividad de, al menos, una ARN polimerasa específica de orgánulo (Tiranti et al., 1997), el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) (Fisher and Clayton, 1985, 1988) y los factores de transcripción mitocondriales B1 y B2 (TFB1M y TFB2M) (Fernández-Silva et al., 2003).

El TFAM forma parte de la familia de proteínas de alta movilidad y posee la capacidad de unirse al ADNmt, de discriminar entre secuencias específicas y no-específicas y de modificar su estructura tridimensional, facilitando de esta forma la unión de la ARN polimerasa al punto de iniciación de la transcripción (Fisher et al., 1992; Parisi and Clayton, 1991; Shadel and Clayton, 1997). El TFAM es capaz de iniciar la transcripción tanto *in vivo* como *in vitro* (Falkenberg et al., 2002) y muestra una afinidad muy distinta por los promotores de transcripción del ADNmt situados en el D-loop: a bajas concentraciones de TFAM el promotor activado es el LSP, mientras que a altas concentraciones lo es el HSP (Garstka et al., 2003). Aún existe cierta controversia acerca del papel del TFAM en la fisiología mitocondrial y celular; además

de su potencial participación en la regulación de la transcripción, también ha sido relacionado con el mantenimiento de la estructura, el grado de empaquetamiento y el control del número de copias de ADNmt en la mitocondria (Kanki et al., 2004; Larsson et al., 1998; Takamatsu et al., 2002), además de una posible conexión con los procesos de apoptosis (Yoshida et al., 2003).

1.2.3. Regulación de la transcripción de proteínas mitocondriales codificadas por el núcleo

Los procesos de biogénesis mitocondrial implican la expresión de unos 1000 genes, de los cuales aproximadamente el 95% están codificados en el núcleo y el resto en el ADNmt (Stojanovski et al., 2003). La existencia de dominios de unión al ADN comunes en el promotor de varios genes nucleares implicados en la función y la biogénesis mitocondrial, pone de manifiesto la existencia de factores de transcripción para una respuesta coordinada (Garesse and Vallejo, 2001).

Los factores de respiración nucleares 1 y 2 (NRF-1 y NRF-2) son unos de los factores de transcripción implicados en la regulación de la función respiratoria y de la biogénesis mitocondrial, ya que han sido relacionados con la transcripción de numerosas subunidades de la cadena respiratoria codificadas en el núcleo (Murakami et al., 1998; Virbasius and Scarpulla, 1991; Xia et al., 1997) y, además, también activan la expresión de factores implicados en la iniciación de la transcripción del ADNmt, como el TFAM (Virbasius and Scarpulla, 1994), el TFB1M y el TFB2M (Gleyzer et al., 2005). Es importante destacar que la existencia de factores como los NRFs no pueden explicar de forma completa la coordinación de la expresión de proteínas mitocondriales en la biogénesis mitocondrial, ya que existen numerosos genes que no tienen una secuencia de unión para estos factores y, por otra parte, existen otras vías mitocondriales reguladas por factores de transcripción sin una aparente relación con la expresión de genes respiratorios mitocondriales.

Diversas investigaciones en los últimos años han puesto de relieve que el PGC-1 α (coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma) podría tener un papel central en la regulación de la biogénesis mitocondrial frente a numerosas situaciones fisiológicas. La expresión de PGC-1 α es muy elevada en tejidos con sistemas mitocondriales muy desarrollados (Puigserver and Spiegelman, 2003) y su expresión se induce de forma importante en situaciones fisiológicas que se caracterizan por un aumento de la demanda mitocondrial para producir energía en forma de ATP o calor, como son la exposición al frío en el TAM y

en el músculo (Puigserver et al., 1998), el ejercicio físico en el músculo (Goto et al., 2000) y el ayuno en el hígado (Yoon et al., 2001). A nivel molecular, el PGC-1 α es una proteína que no tiene capacidad de unirse al ADN, pero puede modular la expresión de algunas proteínas implicadas en el proceso de biogénesis mitocondrial a través de su interacción con los factores de transcripción implicados: el PGC-1 α tiene la capacidad de coactivar la actividad transcripcional de NRF-1, e inducir a su vez la expresión del NRF-1, del NRF-2 y del TFAM (Wu et al., 1999). Además, este coactivador también puede interaccionar con miembros de la superfamilia de receptores nucleares, como el PPAR- γ (receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma) (Puigserver et al., 1998), el receptor de glucocorticoides (Knutti et al., 2000), el receptor de hormonas tiroideas (Puigserver et al., 1998) y el receptor de estrógenos (Tcherepanova et al., 2000).

Más recientemente, se han descrito otros coactivadores homólogos al PGC-1 α , el PGC-1 β y el PRC (coactivador relacionado con el PGC) que, en combinación con la función del PGC-1 α , podrían tener un papel significativo en la biogénesis mitocondrial en el TAM y en la de otros tejidos (Andersson and Scarpulla, 2001; Lin et al., 2002; Scarpulla, 2002).

1.2.4. Tráfico intracelular de proteínas a la mitocondria

Las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo son importadas a la mitocondria mediante un complejo sistema de transporte. Entre estas proteínas podemos destacar las relacionadas con el metabolismo mitocondrial, con el ensamblaje y el mantenimiento de la estructura de las proteínas mitocondriales, así como toda la maquinaria responsable de la expresión y la replicación del ADNmt (Neupert, 1997). Las proteínas mitocondriales que son sintetizadas en el citoplasma tienen en su secuencia un péptido señal en el extremo N-terminal, de carga neta positiva y que adopta una estructura de hélice α . Dicha estructura, que sólo es necesaria para el transporte de la proteína, es eliminada al final del proceso (Hammen and Weiner, 1998). El potencial de membrana es básico para transportar las proteínas en las inmediaciones de la mitocondria (Martin et al., 1991), para su desplegamiento, previo al proceso de internalización (Huang et al., 2002) y para estimular la actividad de translocasas que faciliten el paso de la proteína a través de la membrana mitocondrial interna (Truscott et al., 2003).

1.2.5. La cardiolipina. Un nexo de unión entre la estructura, la función y la biogénesis mitocondrial

La cardiolipina es un glicerofosfolípido dimérico que posee 4 ácidos grasos en su estructura (Lecocq and Ballou, 1964), ubicado mayoritariamente en la membrana mitocondrial interna y en sistemas membranosos que precisen un mantenimiento de un gradiente protónico que asegure el desarrollo de la fosforilación oxidativa (Schlame et al., 2000). La cardiolipina se mantiene durante el ciclo vital de la mitocondria (Haines and Dencher, 2002), aunque hay estudios que han descrito que los niveles de cardiolipina se reducen durante el envejecimiento celular (Maftah et al., 1994; Paradies and Ruggiero, 1990, 1991) y en respuesta a un estado de estrés oxidativo (Ames et al., 1995).

La cardiolipina parece jugar un papel fundamental tanto en la estructura como en la función mitocondrial: estabiliza la membrana mitocondrial interna (Haines and Dencher, 2002; Koshkin and Greenberg, 2002) y modula la actividad de varios complejos de la cadena respiratoria, así como los transportadores de ATP/ADP, de fosfato y de piruvato (Gohil et al., 2004; Schlame et al., 2000). No hay evidencias directas acerca del papel de la cardiolipina sobre la biogénesis mitocondrial, aunque se ha sugerido que podría participar en el anclaje inicial de las proteínas que van a ser transportadas al interior de la mitocondria facilitando la interacción de la proteína con la maquinaria de transporte (Leenhouts et al., 1995), el procesamiento y la integración de las proteínas en la membrana mitocondrial interna (Schlame et al., 2000).

1.2.6 El modelo de subpoblaciones mitocondriales como herramienta para el estudio de la biogénesis mitocondrial

Aunque la estructura mitocondrial básica es muy característica, existen diferencias morfológicas en función de la especie, del tipo de tejido y célula, del grado de actividad metabólica y del estado fisiológico y patológico (Duchen, 2004). Varios estudios han demostrado que la población mitocondrial de TAM (Puigserver et al., 1991, 1992), de hígado (Loud, 1968) y de músculo (McMillin-Wood et al., 1980) es heterogénea y, de hecho, incluso en una misma célula existe diversidad mitocondrial, tanto a nivel morfológico como funcional (Collins et al., 2002).

La población mitocondrial puede ser subdividida en varias subpoblaciones o fracciones mediante centrifugación diferencial, un tipo de técnica ampliamente utilizada para aislar de forma sencilla células y orgánulos a partir de sus propiedades físicas,

como la masa, el tamaño, la densidad y la forma. Así, en función de la velocidad de sedimentación empleada en el aislamiento, las fracciones han sido comúnmente denominadas pesada, media y ligera (Gianotti et al., 1998; Lanni et al., 1996; Matamala et al., 1996; Moreno et al., 1994).

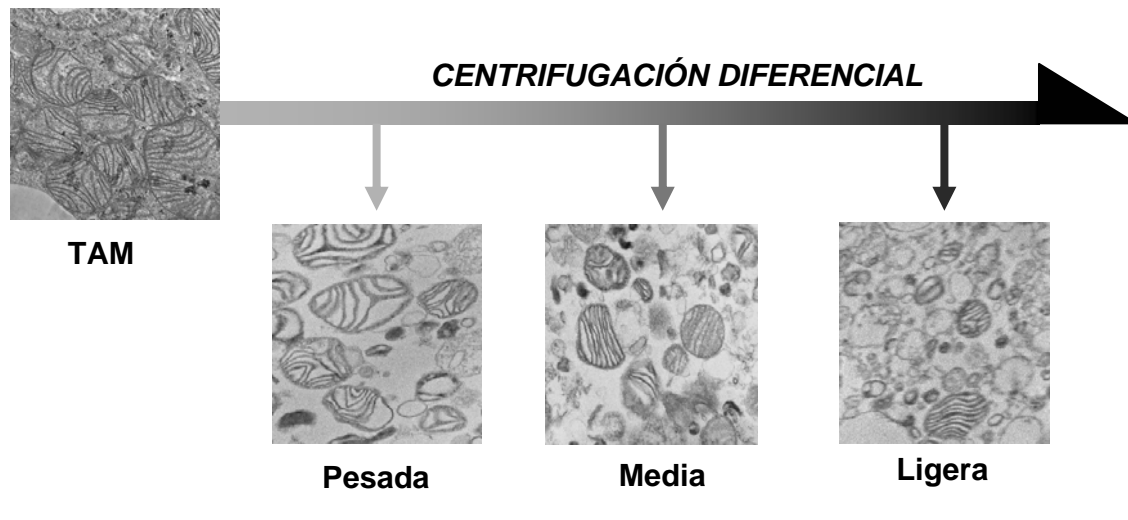


Figura 2. Esquema del proceso de aislamiento de fracciones mitocondriales de tejido adiposo marrón mediante centrifugación diferencial.

En la rata, las subpoblaciones mitocondriales aisladas de TAM responden de distinta forma frente a estímulos fisiológicos o patológicos tales como el ayuno, la exposición y la aclimatación al frío o la obesidad inducida por la sobrealimentación. La exposición al frío provoca un aumento de la capacidad oxidativa y del desacoplamiento, respuesta que es muy evidente en las subpoblaciones ligeras cuando la exposición al estímulo es aguda, o en las pesadas cuando el tiempo de exposición se prolonga (Moreno et al., 1994). En contraste, el ayuno produce una disminución de la capacidad termogénica, con un patrón de respuesta dependiente del tiempo de exposición al estímulo semejante al observado en la exposición al frío (Gianotti et al., 1998). La obesidad dietética, inducida por la ingestión voluntaria de una dieta hipercalórica (dieta de cafetería), produce una falta de respuesta termogénica de la fracción mitocondrial ligera frente al ayuno (Matamala et al., 1996).

También las subpoblaciones mitocondriales aisladas a partir de hígado de rata han mostrado diferencias en sus características morfológicas y funcionales (Lanni et al., 1996; Venditti et al., 2002) y, de manera semejante a lo descrito en TAM, también responden de forma diferencial a estímulos como la exposición al frío (Goglia et al., 1983; Venditti et al., 2004) o el tratamiento con hormonas tiroideas (Goglia et al., 1986).

Estas evidencias han servido como base para el desarrollo de un planteamiento que relacionaría el modelo de subpoblaciones mitocondriales y el proceso de biogénesis mitocondrial, de tal manera que las fracciones ligeras podrían ser formas de transición precursoras de las fracciones más pesadas en el proceso de diferenciación (Gianotti et al., 1998; Koekemoer and Oelofsen, 2001; Lanni et al., 1998).

1.3. Dimorfismo sexual en el balance energético. Implicación de las hormonas sexuales

El balance energético es una situación de equilibrio entre la ingesta y el gasto energético, constituido este último por la energía necesaria para el mantenimiento del metabolismo basal, la actividad física y la termogénesis facultativa o adaptativa. El control del balance energético está estrechamente ligado con la regulación del peso corporal, ya que cuando el gasto energético es similar a la ingesta, el peso corporal se mantiene más o menos constante, mientras que si el gasto es inferior, el excedente de energía es almacenado como grasa y, por tanto, se tiende a ganar peso corporal; si la situación de desequilibrio se prolonga, se puede instaurar un sobrepeso manifiesto que puede desembocar en obesidad (Levine, 2003). Existen diferencias en la distribución del tejido adiposo entre hombres y mujeres (Bjorntorp, 1996), ya que en las mujeres el depósito más importante está localizado en la región glúteo-femoral, mientras que en los hombres está en la región abdominal (Rodríguez-Cuenca et al., 2001). Esta distinta distribución entre géneros está acompañada de diferencias en la funcionalidad de cada depósito, tanto en el almacenamiento, como en la movilización y en la oxidación de ácidos grasos (Blaak, 2001), así como también en la distinta incidencia de patologías secundarias asociadas al sobrepeso y la obesidad (Bjorntorp, 1997).

El TAM, principal efector de la termogénesis facultativa o adaptativa en pequeños mamíferos y recién nacidos, muestra un claro dimorfismo asociado al género en su funcionalidad. Las ratas hembra presentan una mayor capacidad

termogénica, con un contenido de proteína mitocondrial y de UCP1 superior que en los machos. Estas diferencias podrían estar relacionadas con un menor umbral de activación termogénica en las hembras, ya que las diferencias entre géneros desaparecen cuando los animales son expuestos al frío (Quevedo et al., 1998). Ante una situación de sobrealimentación crónica, las ratas hembra adultas tienen una menor respuesta termogénica que los machos (Gianotti et al., 1988; Roca et al., 1999), comportamiento que es independiente del periodo de crecimiento de los animales, ya que se da tanto en animales jóvenes (Rodríguez et al., 2001) como en adultos (Roca et al., 1999).

Las diferencias descritas entre géneros podrían ser debidas a un entorno hormonal distinto y, en concreto, al efecto directo o indirecto de las hormonas sexuales. De hecho, algunos estudios *in vivo* han puesto de manifiesto que la deficiencia en estrógenos en las ratas hembra está relacionada con una menor expresión de la UCP1 en el TAM (Pedersen et al., 2001), mientras que la administración de testosterona a ratas macho no produce efectos significativos sobre la termogénesis (Abelenda et al., 1992). *In vitro*, se ha descrito un efecto directo y diferencial del 17 β -estradiol, la testosterona y la progesterona en la adipogénesis, la expresión de la UCP1 y la actividad lipolítica en adipocitos marrones: las células tratadas con estrógenos y progestágenos muestran unos adipocitos con una mayor capacidad termogénica y actividad lipolítica, en cambio, el tratamiento con testosterona produce una menor diferenciación de los adipocitos, con una expresión de UCP1 y una actividad lipolítica inferior (Monjo et al., 2003; Rodríguez et al., 2002).

El hígado es el órgano que ocupa un lugar central en el metabolismo intermediario y es clave en el balance energético global; en pequeños roedores es el responsable de, al menos, un 20% de la tasa metabólica basal aunque representa únicamente un 4% del peso corporal (Jansky, 1965). En algunos estudios aislados se han descrito diferencias entre ratas macho y hembra tanto en la regulación de la expresión génica (Ahluwalia et al., 2004) como en el contenido de proteínas de origen nuclear (Laz et al., 2004), aunque estos resultados aún no se ha relacionado con diferencias entre ambos géneros en la funcionalidad del tejido hepático. A nivel mitocondrial, se ha observado que las ratas hembra consumen más oxígeno en los distintos estados respiratorios (Valle et al., 2005) y que generan menos especies reactivas de oxígeno, hecho que podría estar asociado a una mayor capacidad antioxidante mitocondrial (Borràs et al., 2003).

Los estudios sobre la implicación de las hormonas sexuales en el metabolismo energético hepático, sobre todo a nivel mitocondrial, son muy escasos. Algunos experimentos *in vivo* han puesto de manifiesto que las mitocondrias de ratas hembra ovariectomizadas generan más especies reactivas de oxígeno, llegando a mostrar niveles similares a los machos (Borràs et al., 2003). Por otra parte, los resultados obtenidos en estudios *in vitro* con hepatocitos en cultivo tratados con estradiol han demostrado un aumento de la expresión del genoma mitocondrial y de la actividad de la cadena respiratoria (Chen et al., 1998), efecto que es bloqueado por un antiestrogénico específico (Chen et al., 1999). Además, la detección en el ADNmt de secuencias putativas de unión a estrógenos (Demonacos et al., 1996; Sekeris, 1990), 2) y la localización en la mitocondria de las distintas isoformas de los receptores de estrógenos, así como su implicación en la respuesta al tratamiento con estradiol (Chen et al., 2004a, 2004b), son hallazgos que sugieren un papel significativo de las hormonas sexuales, en particular de los estrógenos, en el metabolismo energético del hígado a nivel mitocondrial (Chen and Yager, 2004).

2. Objetivos y planteamiento experimental

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Este estudio está enmarcado en un proyecto más amplio desarrollado por el *Grupo de Investigación de Metabolismo Energético y Nutrición*, del *Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut* de la *Universitat de les Illes Balears*, basado en el estudio morfológico y funcional de la mitocondria como centro del metabolismo energético, así como el análisis de algunos factores implicados en la regulación de la biogénesis mitocondrial.

El objetivo principal de este trabajo se ha centrado en el estudio de las diferencias entre ratas macho y hembra en la morfología, la función y la biogénesis mitocondrial del tejido adiposo marrón (TAM), principal efector de la termogénesis facultativa o adaptativa, y del hígado, órgano clave en el metabolismo intermediario y energético.

La biogénesis mitocondrial es un proceso clave en el funcionamiento celular, que consta, a su vez, de dos procesos distintos e íntimamente ligados: la proliferación mitocondrial que consiste en el aumento del número de mitocondrias por célula, y la diferenciación mitocondrial, mediante la cual el orgánulo adquiere las características estructurales y funcionales adecuadas para el desarrollo de las funciones específicas de los distintos tipos celulares (Nisoli et al., 2004). En la presente tesis se ha utilizado como herramienta para el estudio de la biogénesis mitocondrial el fraccionamiento de la población mitocondrial en diferentes subpoblaciones, utilizando la centrifugación diferencial como técnica separativa (Koekemoer and Oelofsen, 2001; Lanni et al., 1996; Moreno et al., 1994). Trabajos previos, realizados en nuestro laboratorio, habían descrito que las subpoblaciones mitocondriales de TAM presentan una respuesta funcional distinta ante diferentes situaciones fisiológicas, como son la exposición al frío (Moreno et al., 1994), el ayuno (Gianotti et al., 1998) o la obesidad dietética inducida por la manipulación de la dieta (Matamala et al., 1996). Con estos antecedentes, nos planteamos si este comportamiento dependía de las características funcionales propias de cada una de las subpoblaciones. Por ello, el primer objetivo de la presente tesis ha sido caracterizar las subpoblaciones mitocondriales de TAM, con la finalidad de conocer las propiedades morfológicas y funcionales (capacidad aeróbico-oxidativa, fosforilativa, termogénica y antioxidante) de cada una de ellas. Los resultados de este primer estudio y su significado están detallados en el **Manuscrito I** (Justo et al., 2005).

Estudios precedentes, habían puesto de manifiesto la existencia de un claro dimorfismo asociado al género en la capacidad termogénica mitocondrial en el TAM.

Las ratas hembra mostraban un mayor gasto energético, asociado a una mayor capacidad oxidativa y termogénica, con mitocondrias de mayor tamaño y con una mayor densidad de crestas que los machos (Rodríguez-Cuenca, et al. 2002, ver Anexo). Estos resultados, constituyen el punto de partida del segundo objetivo de la presente tesis, centrado en analizar si las diferencias morfofuncionales observadas entre ambos géneros a nivel mitocondrial, se reflejan en diferencias en el proceso de biogénesis mitocondrial. Para el desarrollo de este objetivo se han utilizado las subpoblaciones mitocondriales como herramienta de estudio de la biogénesis y se ha llevado a cabo el análisis del tamaño mitocondrial, del estado energético, de la capacidad oxidativa, fosforilativa y termogénica, y de factores reguladores de la expresión del genoma mitocondrial, con la finalidad de estimar el grado de diferenciación mitocondrial. Los resultados obtenidos en este estudio y las principales conclusiones se presentan en los **Manuscritos II** (Justo et al., 2005) y **III**.

Como complemento al estudio llevado a cabo en el TAM, que tiene una función muy especializada, la termogénesis facultativa, se ha planteado como tercer objetivo determinar si también el hígado, órgano que tiene un papel central en la distribución de nutrientes y en el control de la homeostasis energética global, presentaba patrones distintos entre ambos géneros en la morfología y en la función mitocondrial, así como en el proceso de biogénesis, utilizando un diseño experimental muy semejante al planteado en el segundo objetivo. Los resultados más relevantes y las conclusiones obtenidas en este estudio aparecen en el **Manuscrito IV** (Justo et al., 2005).

A continuación se presenta la metodología que se ha utilizado para la consecución de los objetivos propuestos en los distintos estudios efectuados:

- Determinaciones biométricas de los animales y tejidos objeto de experimentación.
- Fraccionamiento mitocondrial por centrifugación mitocondrial para la obtención de la subpoblación pesada M1 a 1.000xg, media M3 a 3.000xg y ligera M8 a 8.000xg.
- Determinación del contenido en proteína total y mitocondrial.
- Cuantificación del contenido en ADN total como indicador del número de células o de la contaminación por núcleos.

- Determinación del contenido en mitocondrias mediante la cuantificación del ADNmt.
- Estudio ultraestructural y morfométrico mitocondrial por medio del análisis de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión.
- Determinación de la capacidad mitocondrial aeróbico-oxidativa y oxidativa mediante el análisis de la actividad de los enzimas citrato sintasa (CS; EC 4.1.3.7) y citocromo c oxidasa (COX; EC 1.9.3.1) y fosforilativa, a través de la ATP sintasa (ATPasa; EC 3.6.1.3).
- Evaluación de la capacidad antioxidante mitocondrial a través de la determinación de la actividad de los enzimas glutatión peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.9) y superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1).
- Determinación de actividades enzimáticas indicadoras de la presencia de orgánulos subcelulares en las fracciones mitocondriales M1, M3 y M8: catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) de peroxisomas, 5'-nucleotidasa (5'-ND; EC 3.1.3.5) de membrana celular, lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27) de citoplasma y fosfatasa ácida (PA; EC 3.1.3.2) de lisosomas.
- Análisis del potencial de membrana y de los niveles de cardiolipina mitocondriales mediante citometría de flujo.
- Determinación de la capacidad respiratoria mitocondrial por respirometría de alta resolución.
- Determinación de la capacidad termogénica a través de la cuantificación de los niveles de UCP1.

Para el desarrollo del proyecto de la presente tesis el doctorando obtuvo una beca del Pla de Formació de Personal Investigador de la Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears (convocatoria del 2000), que incluyó ayudas para dos estancias científicas en la Unitat de Biofísica del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona, en el último trimestre de los años 2002 y 2003.

3. Resultados y discusión

MANUSCRITO I

Brown adipose tissue mitochondrial subpopulations show different morphological and thermogenic characteristics.

Justo R, Oliver J, Gianotti M.

Mitochondrion 5: 45-53, 2005.

[doi:10.1016/j.mito.2004.09.003](https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.09.003)

MANUSCRITO II

Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations.

Justo R, Frontera M, Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Lladó I, García-Palmer FJ, Roca P, Gianotti M.

Life Sciences 76: 1147-1158, 2005.

[doi:10.1016/j.lfs.2004.08.019](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.019)

MANUSCRITO III

Gender differences in brown adipose tissue thermogenic features are due to more highly differentiated mitochondria in female rats.

Justo R, Boada J, Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Bermúdez J, Gianotti M, Oliver J.
Manuscrito.

Gender differences in brown adipose tissue thermogenic features are due to more highly differentiated mitochondria in female rats

¹Roberto Justo, ²Jordi Boada, ¹Esperanza Pujol, ¹Sergio Rodríguez-Cuenca, ¹Magdalena Gianotti, ²Jordi Bermúdez and ¹Jordi Oliver.

1. Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició. Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS). Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain

2. Unitat de Biofísica. Departament de Ciències Fisiològiques II. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Running Head: Gender differences in BAT mitochondrial differentiation

Keywords: sexual dimorphism, mitochondrial biogenesis, mitochondrial fractions, uncoupling protein 1 (UCP1), mitochondrial transcription factor A (TFAM)

Abstract

Gender-related differences in the morphology and functionality of rat brown adipose tissue (BAT) mitochondrial fractions have been previously described, where females contain larger mitochondria accompanied by both higher oxidative and thermogenic capacities. The aim of this study has been focused to go deeply into gender differences in BAT mitochondrial thermogenic characteristics, using mitochondrial fractions as a tool to study mitochondrial biogenesis. Heavy (M1), medium (M3) and light (M8) mitochondrial fractions were isolated by means of differential centrifugation steps at 1000xg, 3000xg and 8000xg, respectively. Then, uncoupling protein 1 (UCP1), mitochondrial membrane potential in active respiration, cardiolipin and mitochondrial transcription factor A (TFAM) protein levels, were measured. Results showed more uncoupled mitochondria in female rats, with an enhanced structural organization and higher tendency of mtDNA transcription than males, which was especially evident in the heavy mitochondrial fraction. Our results suggest the existence of a less-differentiated pool, with similar characteristics in male and female rats, which diverges during mitochondrial differentiation in a gender-dependent way, leading to highly-differentiated mitochondria in females. Therefore, differences in mitochondrial biogenesis pattern between genders could be suggested.

MANUSCRITO IV

Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis.

Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermúdez J, Gianotti M.

American Journal of Physiology-Cell Physiology 2005.

[doi:10.1152/ajpcell.00035.2005](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00035.2005)

4. Recapitulación

4. RECAPITULACIÓN

Los estudios llevados a cabo en la presente tesis se sustentan en tres aspectos básicos:

- 1) La heterogeneidad de la población mitocondrial y la posibilidad de ser fraccionada en distintas subpoblaciones que difieren en sus características morfológicas y funcionales.
- 2) Las diferencias entre géneros en la función mitocondrial del tejido adiposo marrón y del hígado de rata.
- 3) La utilidad del modelo de subpoblaciones mitocondriales como herramienta para el estudio de la biogénesis mitocondrial.

Se ha descrito previamente que las subpoblaciones mitocondriales del TAM – fracción pesada, media y ligera – tienen una respuesta termogénica distinta en función del tipo de estímulo fisiológico al que se ven sometidas, como la exposición al frío (Moreno et al., 1994), el ayuno o la sobreingesta (Gianotti et al., 1998; Matamala et al., 1996). También existe un patrón común en la respuesta a dichas situaciones en función de la duración del estímulo: si el estímulo es agudo la respuesta termogénica se refleja en cambios que afectan especialmente a la fracción mitocondrial ligera (Gianotti et al., 1998; Matamala et al., 1996; Moreno et al., 1994), mientras que si el estímulo es crónico la respuesta se hace patente en la fracción pesada (Gianotti et al., 1998; Moreno et al., 1994). Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que este comportamiento estaría asociado a diferencias en las características morfofuncionales de cada una de las fracciones mitocondriales: por una parte, la fracción pesada contiene mitocondrias más grandes y que presentan una mayor capacidad termogénica, aeróbico-oxidativa, fosforilativa y antioxidante; por el contrario, la fracción ligera es la que contiene las mitocondrias más pequeñas y con unas menores capacidades. Los parámetros analizados, indicadores en su conjunto del grado de diferenciación mitocondrial revelarían, por tanto, una mayor diferenciación en la subpoblación más pesada en comparación con la subpoblación ligera. Si relacionamos estos resultados con la distinta respuesta a los estímulos fisiológicos estudiados, podemos deducir que las fracciones menos diferenciadas responderían a estímulos de tipo agudo, mientras que las más diferenciadas lo harían frente a estímulos de tipo crónico. Por tanto, las mitocondrias de la fracción ligera estarían ligadas a un patrón de funcionalidad más dinámico, con mayor flexibilidad metabólica que las mitocondrias más pesadas. Nuestros resultados también reforzarían la hipótesis que relaciona el modelo de subpoblaciones mitocondriales con la biogénesis

mitocondrial y, más concretamente, con el proceso de diferenciación, en el cual las mitocondrias de la fracción ligera serían las precursoras de las fracciones pesadas (Gianotti et al., 1998; Koekemoer and Oelofsen, 2001; Lanni et al., 1998).

Numerosos estudios realizados en nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto importantes diferencias entre ambos géneros en la función termogénica del TAM (Quevedo et al., 1994; Roca et al., 1999; Rodríguez et al., 2001a, 2001b). Más recientemente, se ha constatado que las ratas hembra presentan un mayor gasto energético global que los machos, diferencia que podría ser debida, al menos en parte, a una mayor actividad del TAM, principal efector de la termogénesis facultativa; así, las ratas hembra presentan un mayor porcentaje de este tejido respecto a su peso corporal, un mayor contenido en proteína total y mitocondrial, además de una mayor capacidad oxidativa y termogénica que los machos. Estas diferencias funcionales también son evidentes a nivel morfológico, ya que las hembras presentan mitocondrias más grandes y con una mayor densidad de crestas (Rodríguez-Cuenca, et al. 2002, ver Anexo). El análisis de las distintas subpoblaciones mitocondriales de TAM realizado en la presente tesis, ha puesto de manifiesto que la fracción ligera, que como se ha comentado anteriormente está constituida por mitocondrias menos diferenciadas, es similar en ambos géneros, tanto en sus características morfológicas como funcionales. En cambio, la fracción pesada muestra diferencias importantes entre géneros, con una mayor capacidad oxidativa y termogénica en las hembras, que se traduce en una mayor maquinaria respiratoria y termogénica por mitocondria, muy evidente en el análisis morfológico, y que se pone de manifiesto con mitocondrias de mayor tamaño. Todas estas características, que sugieren un mayor grado de diferenciación de las mitocondrias de la fracción pesada en las hembras, están acompañadas de unos niveles superiores del factor de transcripción TFAM, parámetro indicativo de una mayor tendencia a la transcripción del ADNmt. Los machos no alcanzan tal grado de diferenciación, aunque muestran una fracción mitocondrial pesada con un mayor contenido en ADNmt, resultado que sugiere un mayor número de mitocondrias y, probablemente, una mayor tasa de proliferación mitocondrial. En su conjunto, las diferencias en las características mitocondriales del TAM descritas entre ambos géneros, podrían ser atribuidas a la existencia de una subpoblación mitocondrial altamente diferenciada en las hembras, hecho que podría ser indicativo de un proceso de biogénesis mitocondrial distinto entre ambos géneros.

Por otra parte, hemos demostrado que un órgano como el hígado, básico en el mantenimiento del balance energético global (Jansky, 1965; Ramsey et al., 2000),

también presenta marcadas diferencias entre géneros en la función mitocondrial, con una capacidad y eficiencia de oxidación de sustratos mayor en las ratas hembra. Estas diferencias no se acompañan de cambios importantes ni en el tamaño, ni en el número de mitocondrias, sino que son debidas fundamentalmente a un incremento de la maquinaria funcional por mitocondria en las hembras. Este hecho podría correlacionarse con una mayor expresión del genoma mitocondrial, tal y como se deduce de los niveles más altos de TFAM en las ratas hembra. Por tanto, el análisis de las subpoblaciones mitocondriales hepáticas ha puesto de manifiesto un comportamiento similar al del TAM, ya que las diferencias observadas en las características funcionales de las mitocondrias hepáticas también se hacen patentes principalmente en la fracción mitocondrial pesada, con mitocondrias mucho más diferenciadas en las hembras, lo cual sugiere también diferencias en el proceso de biogénesis mitocondrial a nivel del tejido hepático.

Aunque la finalidad de la diferenciación mitocondrial en el hígado y en el TAM es muy distinta (en el hígado la diferenciación tiene como objetivo adquirir una mayor maquinaria respiratoria para una síntesis más eficiente de ATP, mientras que en el TAM consistiría en aumentar la capacidad de generación de calor en detrimento de la síntesis de ATP), el estudio llevado a cabo en esta tesis ha puesto de manifiesto que las diferencias entre géneros en las características morfofuncionales de las subpoblaciones mitocondriales son similares en ambos tejidos: una subpoblación mitocondrial poco diferenciada con propiedades comunes en ambos géneros, y otra subpoblación con mitocondrias mucho más diferenciadas en las hembras. El modelo de subpoblaciones ha puesto de manifiesto una clara divergencia en el proceso de diferenciación mitocondrial entre géneros, tanto en el TAM como en el hígado, lo que sugeriría, en primer lugar, una distinta evolución de dicho proceso entre machos y hembras y, en segundo lugar, un factor común a ambos tejidos que influiría en la regulación del proceso de biogénesis mitocondrial. En este sentido, las hormonas sexuales podrían ser los candidatos idóneos para cumplir las dos premisas indicadas, ya que existen evidencias que señalan el efecto de las hormonas sexuales y, en particular los estrógenos, sobre la regulación del metabolismo energético mitocondrial en el TAM y en el hígado, tanto en experimentos *in vivo* (Abelenda et al., 1992; Borràs et al., 2003; Pedersen et al., 2001) como *in vitro* (Chen and Yager, 2004; Monjo et al., 2003; Rodríguez et al., 2002).

Como conclusión, el conjunto de resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis, han demostrado diferencias importantes entre ambos géneros en la función y la

biogénesis mitocondrial, tanto en el TAM como en el hígado. Estos resultados pueden ser el punto de partida para el estudio en humanos de la distinta incidencia entre géneros de diversas patologías, que tienen como origen defectos en el metabolismo energético mitocondrial, y la elaboración de protocolos específicos para tratamientos que tengan como diana terapéutica la mitocondria.

5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES

- I. La caracterización de las subpoblaciones mitocondriales del tejido adiposo marrón ha puesto de manifiesto diferencias importantes tanto en sus propiedades morfológicas como funcionales. Las mitocondrias de la subpoblación pesada, en comparación con las mitocondrias de la ligera, son más grandes y con un mayor contenido en proteína, además de una capacidad aeróbico-oxidativa, termogénica y antioxidante superior. Todas estas características son ilustrativas de un mayor grado de diferenciación de las mitocondrias de la subpoblación pesada en comparación con la ligera, la cual se correspondería con las mitocondrias menos diferenciadas.
- II. Las mitocondrias menos diferenciadas responderían a estímulos fisiológicos agudos, mientras que las más diferenciadas lo harían frente a estímulos crónicos. Las mitocondrias de la subpoblación ligera estarían ligadas a un patrón de funcionalidad más dinámico, con mayor flexibilidad metabólica que las mitocondrias de la subpoblación más pesada. Las subpoblaciones mitocondriales son una buena herramienta para el estudio de la biogénesis mitocondrial, ya que nuestros resultados también reforzarían la hipótesis que relaciona el modelo de subpoblaciones con la biogénesis mitocondrial y, más concretamente, con el proceso de diferenciación, en el cual las mitocondrias de la subpoblación ligera serían las precursoras de las subpoblaciones pesadas.
- III. El análisis de las propiedades morfofuncionales de las distintas subpoblaciones mitocondriales estudiadas en el tejido adiposo marrón, ha puesto de manifiesto un claro dimorfismo sexual. En concreto, la subpoblación ligera está constituida por mitocondrias menos diferenciadas y que presentan características similares en ambos géneros. Por el contrario, la subpoblación pesada muestra una mayor capacidad oxidativa y termogénica en las hembras, acompañada de una mayor tendencia a la transcripción del ADNmt, que se traduce en una mayor maquinaria respiratoria y termogénica por mitocondria y que se pone de manifiesto con mitocondrias de mayor tamaño. La subpoblación pesada sería la principal responsable de la mayor capacidad termogénica que ha sido descrita en este tejido en ratas hembra.
- IV. Las diferencias en las características mitocondriales del tejido adiposo marrón descritas entre ambos géneros, podrían ser atribuidas a la existencia de una

subpoblación mitocondrial altamente diferenciada en las hembras, hecho que podría ser indicativo de un proceso de biogénesis mitocondrial distinto entre ambos géneros.

- V. El hígado también presenta marcadas diferencias entre géneros en la función mitocondrial, con una capacidad y eficiencia de oxidación de sustratos mayor en las ratas hembra. Estas diferencias son debidas, fundamentalmente, a un incremento de la maquinaria funcional por mitocondria, que probablemente se acompaña de una mayor expresión del genoma mitocondrial. El análisis de las subpoblaciones mitocondriales hepáticas ha puesto de manifiesto un comportamiento similar al del tejido adiposo marrón, ya que las diferencias observadas también se hacen patentes principalmente en la subpoblación mitocondrial pesada, con mitocondrias mucho más diferenciadas en las hembras. Esto sugiere diferencias en el proceso de biogénesis mitocondrial también a nivel del tejido hepático.
- VI. Los resultados obtenidos indican que las diferencias entre géneros en las características morfofuncionales de las subpoblaciones mitocondriales son similares en tejido adiposo marrón e hígado: una subpoblación mitocondrial poco diferenciada con propiedades comunes en ambos géneros, y otra subpoblación con mitocondrias mucho más diferenciadas en las hembras. Por tanto, el modelo de subpoblaciones ha puesto de manifiesto una divergencia en el proceso de diferenciación mitocondrial entre ambos géneros, tanto en el tejido adiposo marrón como en el hígado, lo que sugeriría, en primer lugar, una distinta evolución de dicho proceso entre machos y hembras y, en segundo lugar, un factor común a ambos tejidos que influiría en la regulación del proceso de biogénesis mitocondrial. En este sentido, las hormonas sexuales podrían ser los candidatos idóneos para cumplir estas dos premisas.

6. Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abelenda M, Nava MP, Fernández A, and Puerta ML.** Brown adipose tissue thermogenesis in testosterone-treated rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 126: 434-437, 1992.
- Ahluwalia A, Clodfelter KH, and Waxman DJ.** Sexual dimorphism of rat liver gene expression: regulatory role of growth hormone revealed by deoxyribonucleic Acid microarray analysis. *Mol Endocrinol* 18: 747-760, 2004.
- Aloni Y and Attardi G.** Symmetrical in vivo transcription of mitochondrial DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 1757-1761, 1971.
- Ames BN, Shigenaga MK, and Hagen TM.** Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1271: 165-170, 1995.
- Andersson U and Scarpulla RC.** Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21: 3738-3749, 2001.
- Attardi G and Schatz G.** Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4: 289-333, 1988.
- Bjorntorp P.** Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. *Nutrition* 13: 795-803, 1997.
- Bjorntorp P.** The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 291-302, 1996.
- Blaak E.** Gender differences in fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4: 499-502, 2001.
- Bogenhagen DF, Yoza BK, and Cairns SS.** Identification of initiation sites for transcription of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 261: 8488-8494, 1986.
- Borràs C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, and Viña J.** Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 34: 546-552, 2003.
- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, and Giacobino JP.** Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408: 39-42, 1997.
- Cannon B and Nedergaard J.** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359, 2004.
- Carey GB.** Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol* 441: 157-170, 1998.
- Chen J, Gokhale M, Li Y, Trush MA, and Yager JD.** Enhanced levels of several mitochondrial mRNA transcripts and mitochondrial superoxide production during ethinyl estradiol-induced hepatocarcinogenesis and after estrogen treatment of HepG2 cells. *Carcinogenesis* 19: 2187-2193, 1998.
- Chen J, Li Y, Lavigne JA, Trush MA, and Yager JD.** Increased mitochondrial superoxide production in rat liver mitochondria, rat hepatocytes, and HepG2 cells following ethinyl estradiol treatment. *Toxicol Sci* 51: 224-235, 1999.

- Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, and Yager JD.** Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E1011-1022, 2004.
- Chen JQ, Eshete M, Alworth WL, and Yager JD.** Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J Cell Biochem* 93: 358-373, 2004.
- Chen JQ and Yager JD.** Estrogen's Effects on Mitochondrial Gene Expression: Mechanisms and Potential Contributions to Estrogen Carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1028: 258-272, 2004.
- Cinti S.** Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest* 25: 823-835, 2002.
- Clayton DA.** Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* 141: 217-232, 1992.
- Collins S, Daniel KW, Rohlfes EM, Ramkumar V, Taylor IL, and Gettys TW.** Impaired expression and functional activity of the beta 3- and beta 1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6J ob/ob) mice. *Mol Endocrinol* 8: 518-527, 1994.
- Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, and Bootman MD.** Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *Embo J* 21: 1616-1627, 2002.
- Crescenzo R, Mainieri D, Solinas G, Montani JP, Seydoux J, Liverini G, Iossa S, and Dulloo AG.** Skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity and uncoupling protein 3 are differently influenced by semistarvation and refeeding. *FEBS Lett* 544: 138-142, 2003.
- Demonacos CV, Karayanni N, Hatzoglou E, Tsiriyiotis C, Spandidos DA, and Sekeris CE.** Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids* 61: 226-232, 1996.
- Duchen MR.** Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 25: 365-451, 2004.
- Dulloo AG and Samec S.** Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered. *Br J Nutr* 86: 123-139, 2001.
- Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, and Brand MD.** Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415: 96-99, 2002.
- Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, and Gustafsson CM.** Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* 31: 289-294, 2002.
- Fernández-Silva P, Enríquez JA, and Montoya J.** Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 88: 41-56, 2003.
- Fisher RP and Clayton DA.** Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 8: 3496-3509, 1988.
- Fisher RP and Clayton DA.** A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J Biol Chem* 260: 11330-11338, 1985.

- Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, and Clayton DA.** DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem* 267: 3358-3367, 1992.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, and Warden CH.** Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15: 269-272, 1997.
- Garesse R and Vallejo CG.** Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263: 1-16, 2001.
- Garstka HL, Schmitt WE, Schultz J, Sogl B, Silakowski B, Pérez-Martos A, Montoya J, and Wiesner RJ.** Import of mitochondrial transcription factor A (TFAM) into rat liver mitochondria stimulates transcription of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 31: 5039-5047, 2003.
- Gianotti M, Clapés J, Lladó I, and Palou A.** Effect of 12, 24 and 72 hours fasting in thermogenic parameters of rat brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. *Life Sci* 62: 1889-1899, 1998.
- Gianotti M, Roca P, and Palou A.** Body weight and tissue composition in rats made obese by a cafeteria diet. Effect of 24 hours starvation. *Horm Metab Res* 20: 208-212, 1988.
- Gleyzer N, Vercauteren K, and Scarpulla RC.** Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* 25: 1354-1366, 2005.
- Goffart S and Wiesner RJ.** Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol* 88: 33-40, 2003.
- Goglia F, Liverini G, De Leo T, and Barletta A.** Thyroid state and mitochondrial population during cold exposure. *Pflugers Arch* 396: 49-53, 1983.
- Goglia F, Liverini G, Lanni A, Iossa S, and Barletta A.** Tri-iodothyronine enhances the formation of light mitochondria during cold exposure. *Comp Biochem Physiol B* 85: 869-873, 1986.
- Gohil VM, Hayes P, Matsuyama S, Schagger H, Schlame M, and Greenberg ML.** Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent. *J Biol Chem* 279: 42612-42618, 2004.
- Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozei T, Tabata I, and Shimokawa T.** cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 350-354, 2000.
- Haines TH and Dencher NA.** Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 528: 35-39, 2002.
- Hammen PK and Weiner H.** Mitochondrial leader sequences: structural similarities and sequence differences. *J Exp Zool* 282: 280-283, 1998.
- Himms-Hagen J.** Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *Faseb J* 4: 2890-2898, 1990.
- Huang S, Ratliff KS, and Matouschek A.** Protein unfolding by the mitochondrial membrane potential. *Nat Struct Biol* 9: 301-307, 2002.
- Jansky L.** Adaptability of heat production mechanism in homeotherms. *Acta Univ Carol Biol* 1: 1-91, 1965.

- Jezek P, Zackova M, Ruzicka M, Skobisova E, and Jaburek M.** Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies. *Physiol Res* 53 Suppl 1: S199-211, 2004.
- Kanki T, Nakayama H, Sasaki N, Takio K, Alam TI, Hamasaki N, and Kang D.** Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. *Ann N Y Acad Sci* 1011: 61-68, 2004.
- Knutti D, Kaul A, and Kralli A.** A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol Cell Biol* 20: 2411-2422, 2000.
- Koekemoer TC and Oelofsen W.** Properties of porcine white adipose tissue and liver mitochondrial subpopulations. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 889-901, 2001.
- Koshkin V and Greenberg ML.** Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *Biochem J* 364: 317-322, 2002.
- Kozak LP and Harper ME.** Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure. *Annu Rev Nutr* 20: 339-363, 2000.
- Lafontan M, Barbe P, Galitzky J, Tavernier G, Langin D, Carpenne C, Bousquet-Melou A, and Berlan M.** Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Hum Reprod* 12 Suppl 1: 6-20, 1997.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A, and Goglia F.** 3,5-Diiodo-L-thyronine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine both improve the cold tolerance of hypothyroid rats, but possibly via different mechanisms. *Pflugers Arch* 436: 407-414, 1998.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A, and Goglia F.** Biochemical and functional differences in rat liver mitochondrial subpopulations obtained at different gravitational forces. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 337-343, 1996.
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, and Clayton DA.** Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18: 231-236, 1998.
- Laz EV, Wiwi CA, and Waxman DJ.** Sexual dimorphism of rat liver nuclear proteins: regulatory role of growth hormone. *Mol Cell Proteomics* 3: 1170-1180, 2004.
- Lecocq J and Ballou CE.** On the Structure of Cardiolipin. *Biochemistry* 155: 976-980, 1964.
- Leenhouts JM, Torok Z, Chupin V, and de Kruijff B.** A molecular model for the specific cardiolipin-presequence interactions. *Biochem Soc Trans* 23: 968-971, 1995.
- Levine JA.** Non-exercise activity thermogenesis. *Proc Nutr Soc* 62: 667-679, 2003.
- Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, and Spiegelman BM.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* 277: 1645-1648, 2002.
- Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, and Kimmel AR.** Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol* 10: 51-58, 1999.
- Loud AV.** A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 37: 27-46, 1968.
- Lowell BB and Spiegelman BM.** Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404: 652-660, 2000.

- Maftah A, Ratinaud MH, Dumas M, Bonte F, Meybeck A, and Julien R.** Human epidermal cells progressively lose their cardiolipins during ageing without change in mitochondrial transmembrane potential. *Mech Ageing Dev* 77: 83-96, 1994.
- Martin J, Mahlke K, and Pfanner N.** Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem* 266: 18051-18057, 1991.
- Matamala JC, Gianotti M, Pericàs J, Quevedo S, Roca P, Palou A, and García-Palmer FJ.** Changes induced by fasting and dietetic obesity in thermogenic parameters of rat brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. *Biochem J* 319: 529-534, 1996.
- McMillin-Wood J, Wolkowicz PE, Chu A, Tate CA, Goldstein MA, and Entman ML.** Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. *Biochim Biophys Acta* 591: 251-265, 1980.
- Miller FJ, Rosenfeldt FL, Zhang C, Linnane AW, and Nagley P.** Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res* 31: e61, 2003.
- Monjo M, Rodríguez AM, Palou A, and Roca P.** Direct effects of testosterone, 17 beta-estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. *Endocrinology* 144: 4923-4930, 2003.
- Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, and Attardi G.** Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7195-7199, 1982.
- Moreno M, Puigserver P, Llull J, Gianotti M, Lanni A, Goglia F, and Palou A.** Cold exposure induces different uncoupling-protein thermogenin masking/unmasking processes in brown adipose tissue depending on mitochondrial subtypes. *Biochem J* 300: 463-468, 1994.
- Murakami T, Shimomura Y, Yoshimura A, Sokabe M, and Fujitsuka N.** Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta* 1381: 113-122, 1998.
- Murphy WI, Attardi B, Tu C, and Attardi G.** Evidence for complete symmetrical transcription in vivo of mitochondrial DNA in HeLa cells. *J Mol Biol* 99: 809-814, 1975.
- Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, and Cannon B.** UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504: 82-106, 2001.
- Neupert W.** Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66: 863-917, 1997.
- Nicholls D, Cunningham S, and Wiesinger H.** Mechanisms of thermogenesis in brown adipose tissue. *Biochem Soc Trans* 14: 223-225, 1986.
- Nicholls DG.** Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The control of respiration and the proton electrochemical potential gradient by possible physiological effectors of the proton conductance of the inner membrane. *Eur J Biochem* 49: 573-583, 1974.
- Nisoli E, Clementi E, Moncada S, and Carruba MO.** Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem Pharmacol* 67: 1-15, 2004.

- Paradies G and Ruggiero FM.** Age-related changes in the activity of the pyruvate carrier and in the lipid composition in rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1016: 207-212, 1990.
- Paradies G and Ruggiero FM.** Effect of aging on the activity of the phosphate carrier and on the lipid composition in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 284: 332-337, 1991.
- Parisi MA and Clayton DA.** Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252: 965-969, 1991.
- Pedersen SB, Bruun JM, Kristensen K, and Richelsen B.** Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 191-197, 2001.
- Puigserver P, Lladó I, Palou A, and Gianotti M.** Evidence for masking of brown adipose tissue mitochondrial GDP-binding sites in response to fasting in rats made obese by dietary manipulation. Effects of reversion to standard diet. *Biochem J* 279: 575-579, 1991.
- Puigserver P, Palou A, and Gianotti M.** Dietary regulation of fasting-induced mitochondrial protein degradation in adult rat brown adipose tissue. *Biochem Int* 27: 1037-1046, 1992.
- Puigserver P and Spiegelman BM.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24: 78-90, 2003.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, and Spiegelman BM.** A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839, 1998.
- Quevedo MR, Price GM, Halliday D, Pacy PJ, and Millward DJ.** Nitrogen homeostasis in man: diurnal changes in nitrogen excretion, leucine oxidation and whole body leucine kinetics during a reduction from a high to a moderate protein intake. *Clin Sci (Colch)* 86: 185-193, 1994.
- Quevedo S, Roca P, Picó C, and Palou A.** Sex-associated differences in cold-induced UCP1 synthesis in rodent brown adipose tissue. *Pflugers Arch* 436: 689-695, 1998.
- Ramsey JJ, Harper ME, and Weindruch R.** Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radic Biol Med* 29: 946-968, 2000.
- Reynier P, May-Panloup P, Chretien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barriere P, and Malthiery Y.** Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 7: 425-429, 2001.
- Ricquier D and Bouillaud F.** The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *J Biochem* 345 Pt 2: 161-179, 2000.
- Ricquier D, Miroux B, Larose M, Cassard-Doulcier AM, and Bouillaud F.** Endocrine regulation of uncoupling proteins and energy expenditure. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2: S86-88, 2000.
- Roca P, Rodríguez AM, Oliver P, Bonet ML, Quevedo S, Picó C, and Palou A.** Brown adipose tissue response to cafeteria diet-feeding involves induction of the UCP2 gene and is impaired in female rats as compared to males. *Pflugers Arch* 438: 628-634, 1999.

- Rodríguez AM, Monjo M, Roca P, and Palou A.** Opposite actions of testosterone and progesterone on UCP1 mRNA expression in cultured brown adipocytes. *Cell Mol Life Sci* 59: 1714-1723, 2002.
- Rodríguez AM, Quevedo-Coli S, Roca P, and Palou A.** Sex-dependent dietary obesity, induction of UCPs, and leptin expression in rat adipose tissues. *Obes Res* 9: 579-588, 2001.
- Rodríguez E, Monjo M, Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Amengual B, Roca P, and Palou A.** Sexual dimorphism in the adrenergic control of rat brown adipose tissue response to overfeeding. *Pflugers Arch* 442: 396-403, 2001.
- Rodríguez-Cuenca S, Roca P, and Palou A.** Diferencias sexuales en la distribución y función de los tejidos adiposos. *Nutrición Clínica XXI*: 14-34, 2001.
- Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, and Ricquier D.** The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1: S130-135, 2004.
- Scarpulla RC.** Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286: 81-89, 2002.
- Schlame M, Rua D, and Greenberg ML.** The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* 39: 257-288, 2000.
- Sekeris CE.** The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo* 4: 317-320, 1990.
- Shadel GS and Clayton DA.** Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 66: 409-435, 1997.
- Shrago E and Strieleman PJ.** The biochemical mechanism of brown fat thermogenesis. *World Rev Nutr Diet* 53: 171-217, 1987.
- Stojanovski D, Johnston AJ, Streimann I, Hoogenraad NJ, and Ryan MT.** Import of nuclear-encoded proteins into mitochondria. *Exp Physiol* 88: 57-64, 2003.
- Svoboda P, Unelius L, Dicker A, Cannon B, Milligan G, and Nedergaard J.** Cold-induced reduction in Gi alpha proteins in brown adipose tissue. Effects on the cellular hypersensitization to noradrenaline caused by pertussis-toxin treatment. *Biochem J* 314 (Pt 3): 761-768, 1996.
- Takamatsu C, Umeda S, Ohsato T, Ohno T, Abe Y, Fukuoh A, Shinagawa H, Hamasaki N, and Kang D.** Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep* 3: 451-456, 2002.
- Tcherepanova I, Puigserver P, Norris JD, Spiegelman BM, and McDonnell DP.** Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J Biol Chem* 275: 16302-16308, 2000.
- Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M, and Zeviani M.** Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet* 6: 615-625, 1997.
- Truscott KN, Brandner K, and Pfanner N.** Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* 13: R326-337, 2003.
- Tzagoloff A.** *Mitochondria*. New York: Plenum Press, 1982.
- Valet P, Grujic D, Wade J, Ito M, Zingaretti MC, Soloveva V, Ross SR, Graves RA, Cinti S, Lafontan M, and Lowell BB.** Expression of human alpha 2-adrenergic

- receptors in adipose tissue of beta 3-adrenergic receptor-deficient mice promotes diet-induced obesity. *J Biol Chem* 275: 34797-34802, 2000.
- Valle A, Català-Niell A, Colom B, García-Palmer FJ, Oliver J, and Roca P.** Sex-related differences in energy balance in response to caloric restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005.
- Venditti P, Costagliola IR, and Di Meo S.** H₂O₂ production and response to stress conditions by mitochondrial fractions from rat liver. *J Bioenerg Biomembr* 34: 115-125, 2002.
- Venditti P, De Rosa R, Caldarone G, and Di Meo S.** Functional and biochemical characteristics of mitochondrial fractions from rat liver in cold-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 61: 3104-3116, 2004.
- Virbasius JV and Scarpulla RC.** Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1309-1313, 1994.
- Virbasius JV and Scarpulla RC.** Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Mol Cell Biol* 11: 5631-5638, 1991.
- Wallace DC.** Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 61: 1175-1212, 1992.
- Wiesner RJ, Ruegg JC, and Morano I.** Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 553-559, 1992.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, and Spiegelman BM.** Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115-124, 1999.
- Xia Y, Buja LM, Scarpulla RC, and McMillin JB.** Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11399-11404, 1997.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, and Spiegelman BM.** Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413: 131-138, 2001.
- Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Itoh H, Kang D, and Kohno K.** P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* 63: 3729-3734, 2003.

7. Anexo

MANUSCRITO V

Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue.

Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Justo R, Frontera M, Oliver J, Gianotti M, Roca P.

The Journal of Biological Chemistry 277: 42958-42963, 2002.

[doi:10.1074/jbc.M207229200](https://doi.org/10.1074/jbc.M207229200)

MANUSCRITO VI

Morphofunctional changes in the mitochondrial subpopulations of conceptus tissues during the placentation process.

Justo R, Alcolea MP, Colom B, Riera AN, Gianotti M, García-Palmer FJ.

Cellular and Molecular Life Sciences 59: 2199-2209, 2002.

[doi:10.1007/s000180200019](https://doi.org/10.1007/s000180200019)

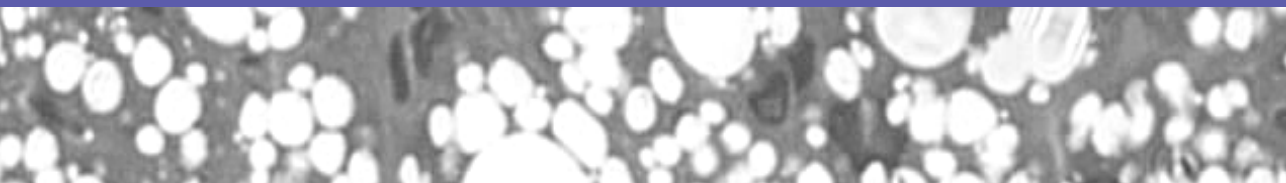
MANUSCRITO VII

Gender- and site-related effects on lipolytic capacity of rat white adipose tissue.

Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Frontera M, Justo R, Lladó I, Kraemer FB, Gianotti M, Roca P.

Cellular and Molecular Life Sciences 60: 1982-1989, 2003.

[doi: 10.1007/s00018-003-3125-5](https://doi.org/10.1007/s00018-003-3125-5)



Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut
Institut Universitari en Ciències de la Salut (IUNICS)
Universitat de les Illes Balears



Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició